

长链非编码 RNA ZNF667-AS1 在非小细胞肺癌组织中表达上调*

梁海梅* 欧宗兴 王蕾 陈忠仁

中南大学湘雅医学院附属海口医院呼吸与危重症医学科,海南海口 570208

摘要 目的:探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中长链非编码 RNA(lncRNA) 锌指蛋白 667 反义 RNA1(ZNF667-AS1)的表达水平。方法:97 例 NSCLC 患者被纳入本研究,术中留取新鲜的癌组织及对应癌旁组织,采用实时定量聚合酶链式反应(PCR)法检测 lncRNA ZNF667-AS1 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,分析 lncRNA ZNF667-AS1 的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系,绘制受试者工作特征(ROC)曲线,评估 lncRNA ZNF667-AS1 用于诊断 NSCLC 的价值,分析癌组织中 VEGF 的表达与 lncRNA ZNF667-AS1 表达的相关性。结果:PCR 检测结果显示,97 例 NSCLC 患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的平均相对表达量明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。不同性别、年龄、肿瘤直径及病理组织类型的 NSCLC 患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05),但不同组织分化程度、临床分期、浸润程度及有无淋巴结转移的患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量比较,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,NSCLC 癌组织中 VEGF 的相对表达量明显高于癌旁组织($P < 0.01$),NSCLC 癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量与 VEGF 的表达呈正相关($P < 0.05$)。由 ROC 曲线可知,lncRNA ZNF667-AS1 诊断 NSCLC 的 AUC 为 0.792(95% CI:0.683-0.911, $P < 0.05$),特异性为 81.23%,敏感度为 86.12%。结论:lncRNA ZNF667-AS1 在 NSCLC 组织中表达上调,其可能作为一种促癌因子参与 NSCLC 的发生发展过程。

关键词 非小细胞肺癌;长链非编码 RNA;ZNF667-AS1

中图分类号 R734.2

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzz20220411

Up-regulation of long non-coding RNA ZNF667-AS1 in non-small cell lung cancer tissues LIANG Hai-mei*, OU Zong-xing, WANG Lei, CHEN Zhong-ren. Pulmonary and Critical Care Medicine Department, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital, Hainan Haikou 570208, China
Corresponding author: LIANG Hai-mei, E-mail:lianghaimeit88@163.com

Abstract Objective: To investigate the expression level of long non-coding RNA (lncRNA) zinc finger protein 667 antisense RNA1 (ZNF667-AS1) in non-small cell lung cancer tissues. Methods: A total of 97 patients with NSCLC were included in this study. Fresh cancer tissues and corresponding paracancerous tissues were collected during surgery, and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect lncRNA ZNF667-AS1 and vascular endothelial growth factor (VEGF). The relationship between the expression of lncRNA ZNF667-AS1 and the clinicopathological characteristics of NSCLC patients was analyzed. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn, and the value of lncRNA ZNF667-AS1 in the diagnosis of NSCLC was evaluated. Correlation between lncRNA ZNF667-AS1 expression and VEGF expression in lung cancer tissues was analyzed. Results: The PCR results showed that the average relative expression of lncRNA ZNF667-AS1 in cancer tissues of 97 NSCLC patients was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expression of lncRNA ZNF667-AS1 in cancer tissues of NSCLC patients with different genders, ages, tumor diameters and pathological tissue types (all $P > 0.05$). The relative expression of lncRNA ZNF667-AS1 in cancer tissues of patients with or without lymph node metastasis showed statistically significant difference ($P < 0.05$). The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the relative expression of VEGF in NSCLC cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.01$), and the relative expression of lncRNA ZNF667-AS1 in NSCLC cancer tissues was positively correlated with the expression of VEGF ($P < 0.01$). The area under the ROC curve (AUC) of lncRNA ZNF667-AS1 in the diagnosis of NSCLC was 0.792 (95% CI: 0.683-0.911, $P < 0.05$), the specificity was 81.23%, and the sensitivity was 86.12%. Conclusion: The expression of lncRNA ZNF667-AS1 is up-regulated in NSCLC tissues, and it may be involved in the occurrence and development of NSCLC as a tumor-promoting factor.

Key words Non-small cell lung cancer; Long non-coding RNA; ZNF667-AS1

* 基金项目:海南省自然科学基金资助(No:818MS136)

* 通信作者:梁海梅,E-mail:lianghaimeit88@163.com,海南省海口市人民大道 43 号

长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200nt 的非编码 RNA^[1]。lncRNAs 在多种生理过程和疾病进展中发挥重要作用,可在表观遗传学、转录及转录后等多个水平调控生理、病理过程^[2]。锌指蛋白 667 反义 RNA1 (zinc finger protein 667 antisense RNA1, ZNF667-AS1) 是新近发现的一种 lncRNA,研究显示 ZNF667-AS1 可影响宫颈癌、胶质瘤等肿瘤细胞的周期和迁移,进而影响肿瘤的生长和转移^[3,4]。本文拟探讨非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC) 组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达水平及临床意义。

资料与方法

一般资料 收集 2019 年 6 月-2020 年 6 月中南大学湘雅医学院附属海口医院收治的 97 例 NSCLC 患者临床资料,所有患者均接受手术治疗,病理组织学诊断为原发性 NSCLC,术前均未接受任何放化疗等治疗,排除合并其他肿瘤。97 例 NSCLC 患者 (男 58,女 39),年龄 41~76 岁,平均 (59.4 ± 9.2) 岁,术中留取新鲜的癌组织及对应癌旁组织 (距癌组织边缘 ≥ 1 cm),并立即经液氮冷冻处理,于 -80°C 的冰箱中保存待用。本研究经医院伦理委员会批准。

实时定量聚合酶链式反应法检测 lncRNA ZNF667-AS1 和血管内皮生长因子的表达 分别取约 50 mg 的癌组织及癌旁组织样本经超声匀浆,使用 Trizol 试剂 (Thermo Fisher 公司) 提取组织总 RNA,焦碳酸二乙酯水溶解总 RNA,应用 Nanodrop 2 000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher 公司) 检测总 RNA 的纯度及浓度。按照逆转录试剂盒 (Takara 公司) 操作说明书进行逆转录反应,每组设 3 个复孔,反应条件: 25°C 10 min, 37°C 40 min, 90°C 5 min,产物置于 4°C 保存待用;反应体系:总 RNA $1\mu\text{L}$ 、PrimeScript RTase $1\mu\text{L}$ 、dNTP Mixture $1\mu\text{L}$ 、 $5\times$ PrimeScript Buffer $0.5\mu\text{L}$ 、 $5\times$ PrimeScript Buffer $4\mu\text{L}$ 、Oligo dT Primer $1\mu\text{L}$ 、DEPC 水补至 $20\mu\text{L}$ 。按照实时定量 PCR 试剂盒 (Takara 公司) 操作说明书进行操作,每组设 3 个复孔,反应条件: 95°C 1 min 预变性, 95°C 20 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环,反应体系: cDNA 模板 $2\mu\text{L}$ 、上下游引物各 $1\mu\text{L}$ 、 $2\times$ SYBR Premix Ex Taq $12.5\mu\text{L}$ 、灭菌蒸馏水补至 $25\mu\text{L}$ 。lncRNA ZNF667-AS1 引物序列: 上游引物 5'-CTGGGATCAGAGAGCAAAGG-3', 下游引物 5'-

CTGTAGAAAGGCCCCG-3'; GAPDH 引物序列: 上游引物 5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3', 下游引物 5'-ATGATCTT2GAGGCTGTTGTCATA-3'; 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 引物序列: 上游引物 5'-ATGAGAGCAACCTC-CGTGAG-3', 下游引物 5'-CCCCCCCAGGAAGAATC-CGG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算 lncRNA ZNF667-AS1 和 VEGF 的表达量, lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 (lncRNA ZNF667-AS1) - $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 [甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)], VEGF 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 (VEGF) - $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 (GAPDH)。

统计学分析 采用 SPSS 20.00 统计学软件。计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验或单因素方差分析,计数资料用百分数 (%) 表示,采用 χ^2 检验,采用 ROC 曲线分析长链非编码 RNA ZNF667-AS1 诊断 NSCLC 的临床价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

NSCLC 癌组织及癌旁组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达 97 例 NSCLC 患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的平均相对表达量明显高于癌旁组织 (1.18 ± 0.23 vs 0.16 ± 0.05 , $t = 6.554$, $P < 0.05$), 见图 1。

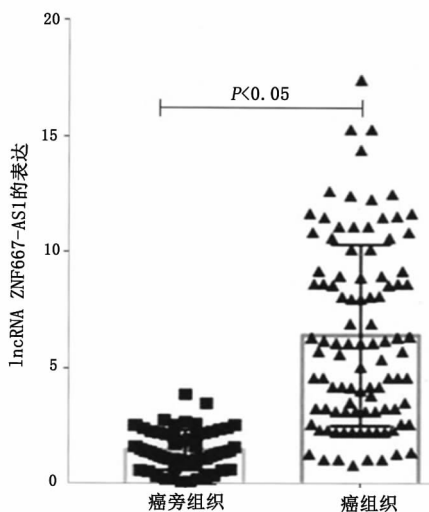


图 1 NSCLC 组织及癌旁组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达

NSCLC 患者 lncRNA ZNF667-AS1 的表达与临床病理特征的关系 不同组织分化程度、临床分期、浸润程度及有无淋巴结转移的患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量比较,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表 1。

表 1 NSCLC 患者 lncRNA ZNF667-AS1 的表达与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

基本资料及病理特征	例	lncRNA ZNF667-AS1 表达水平	t/F 值	P 值
性别			1.815	0.067
男	58	1.16 ± 0.17		
女	39	1.19 ± 0.15		
年龄(岁)			0.574	0.331
<60	56	1.17 ± 0.13		
≥60	41	1.29 ± 0.14		
肿瘤直径(cm)			1.713	0.082
<5	55	1.16 ± 0.15		
≥5	42	1.20 ± 0.13		
病理组织类型			0.612	0.504
腺癌	64	1.19 ± 0.15		
鳞癌	31	1.18 ± 0.16		
大细胞癌	2	1.16 ± 0.14		
组织分化程度			15.182	< 0.001
低分化	49	1.46 ± 0.19		
中分化	21	1.07 ± 0.16		
高分化	27	0.89 ± 0.08		
临床分期			21.065	< 0.001
I 期	18	0.87 ± 0.07		
II 期	37	1.26 ± 0.15		
III 期	42	1.39 ± 0.21		
淋巴结转移			12.823	< 0.001
是	48	1.38 ± 0.12		
否	49	1.01 ± 0.15		
深层浸润			15.602	< 0.001
是	41	1.33 ± 0.14		
否	56	0.95 ± 0.10		

NSCLC 癌组织中 VEGF 与 lncRNA ZNF667-AS1 表达的相关性 NSCLC 癌组织中 VEGF 的相对表达量明显高于癌旁组织(4.86 ± 1.03 vs 1.12 ± 0.67 , $t=5.561$, $P<0.01$), NSCLC 癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.514$, $P<0.05$)。

ROC 曲线分析 由 ROC 曲线可知, lncRNA ZNF667-AS1 诊断 NSCLC 的 AUC 为 0.792(95% CI: 0.683 ~ 0.911, $P<0.05$), 诊断特异性为 81.23%, 敏感度为 86.12%, 见图 2。

讨 论

lncRNA 是一类不编码蛋白质的 RNA, 其在肿瘤细胞增殖、迁移、凋亡等多个方面发挥调控作用^[5,6]。研究发现, 在肿瘤细胞中, 某些特定的 lncRNA 表达发生改变, 这种表达水平的变化可作为

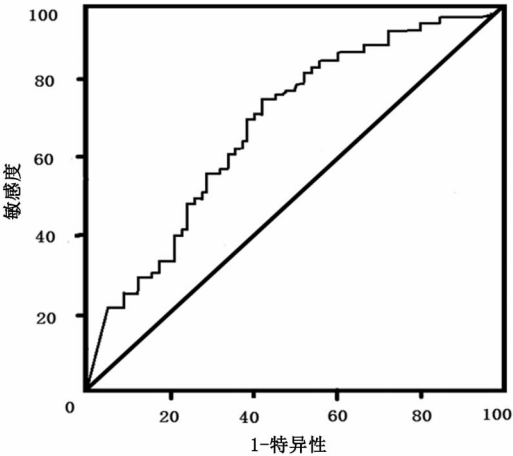


图 2 lncRNA ZNF667-AS1 诊断 NSCLC 的 ROC 曲线

恶性肿瘤诊断的标志物及治疗靶点^[7,8]。近年在 NSCLC 中发现了多种 lncRNA^[9], ZNF667-AS1 在多种恶性肿瘤中表达异常, 可影响肿瘤细胞的生长和转移^[10], 但目前尚不清楚其在 NSCLC 中的相关作用。本研究发现, 97 例 NSCLC 患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的平均相对表达量明显高于癌旁组织, 提示 NSCLC 组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达上调可能与 NSCLC 的发病有关。本研究中不同组织分化程度、临床分期、浸润程度及有淋巴结转移的患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量差异有统计学意义(P 均 <0.05), 即分化程度越低、TNM 分期越高、深层浸润、有淋巴结转移, 则患者癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 表达水平越高。由于分化程度低、TNM 分期高是肿瘤恶性生物学行为的表现, 且淋巴结转移是患者预后不良的重要指标^[11], 故 lncRNA ZNF667-AS1 表达水平升高可能是患者预后不良的潜在指标, 下调 lncRNA ZNF667-AS1 的表达可能是临床治疗 NSCLC 的一个潜在靶点。

VEGF 是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子, 可在体内诱导血管新生, 而肿瘤的生长和转移与血管新生关系密切^[12]。本研究发现, NSCLC 癌组织中 VEGF 的相对表达量明显高于癌旁组织, 而且 NSCLC 癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量与 VEGF 的表达呈正相关($P<0.05$), 表明 lncRNA ZNF667-AS 可能通过促进血管生成而促进 NSCLC 的发生发展。通过 ROC 曲线分析, lncRNA ZNF667-AS1 诊断 NSCLC 的特异性、敏感度较高, 提示 lncRNA ZNF667-AS1 可能参与 NSCLC 的发生进展过程, 也可能成为 NSCLC 临床诊断标记物。

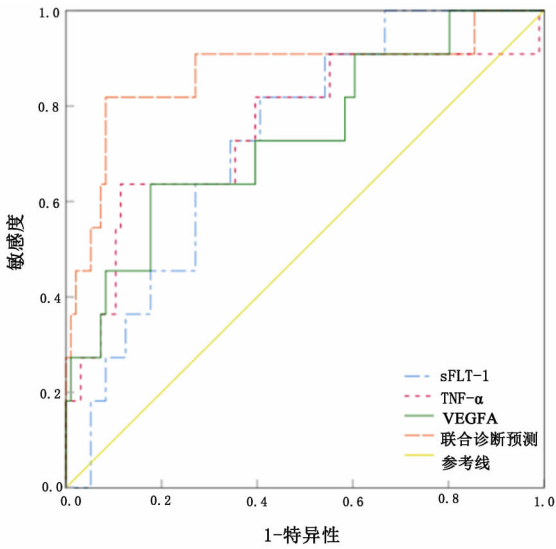


图1 入院时血清 sFlt-1、TNF-α、VEGFA 预测 AP 患者预后不良的 ROC 曲线

AP 病理发展过程中至关重要。本研究显示,预后不良 AP 患者入院时血清中 sFlt-1、VEGFA 和 TNF-α 表达水平显著高于预后良好 AP 患者,入院时血清 sFlt-1、VEGFA 和 TNF-α 三者联合诊断的 AUC 为 0.868,三者联合诊断效果显著优于单独 sFlt-1、VEGFA 和 TNF-α, sFlt-1、VEGFA 和 TNF-α 三项联合可能成为监测 AP 疗效及预后评估的有效生物标志物。

参考文献

1 van Dijk SM, Hallensleben NDL, van Santvoort HC, et al. Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials[J]. Gut, 2017, 66(11):2024-2032.

(上接第 307 页)

参考文献

1 Ding YZ, Zhang ZW, Liu YL, et al. Relationship of long noncoding RNA and viruses[J]. Genomics, 2016, 107(4):150-154.
2 Li J, Li Z, Zheng W, et al. LncRNA-ATB: An indispensable cancer-related long noncoding RNA[J]. Cell Proliferation, 2017, 47(1):95-102.
3 Zhao LP, Li RH, Han DM, et al. Independent prognostic Factor of low-expressed LncRNA ZNF667-AS1 for cervical cancer and inhibitory function on the proliferation of cervical cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(23):5353-5360.
4 Chen X, Huang Y, Shi D, et al. LncRNA ZNF667-AS1 Promotes ABLIM1 expression by adsorbing microRNA-1290 to suppress nasopharyngeal carcinoma cell progression[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(4):4397-4409.
5 钱慧, 钱文霞. 支气管哮喘患者急性发作期外周血 LncRNA NEAT1 表达及与 Th1/Th2 平衡的关系[J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26(1):33-36.
6 Burris HH, Just AC, Haviland MJ, et al. Long noncoding RNA expression in the cervix mid-pregnancy is associated with the length of gesta-

2 李刚, 王学莉. 急性胰腺炎患者血清 miR-551-5p 和 miR-126a-5p 水平与病情严重程度相关性[J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26(3):203-206.
3 Zhao Q, Wei Y, Pandol SJ, et al. STING signaling promotes inflammation in experimental acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2018, 154(6):1822-1835.
4 James TW, Crockett SD. Management of acute pancreatitis in the first 72 hours[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2018, 34(5):330-335.
5 Fatima LA, Campello RS, Santos RS, et al. Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):16716-16730.
6 Benhadou F, Glitzner E, Brisebarre A, et al. Epidermal autonomous VEGFA/Flt1/Nrp1 functions mediate psoriasis-like disease[J]. Sci Adv, 2020, 6(2):5849-5864.
7 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 急性胰腺炎诊治指南(2014)[J]. 中华肝胆外科杂志, 2015, 21(1):1-4.
8 王锦生, 徐红波, 王维钢. sFlt-1、AMY 及 LIP 联合检测对急性胰腺炎的早期诊断价值[J]. 国际消化病杂志, 2018, 38(2):106-110.
9 Shibuya M. VEGF-VEGFR system as a target for suppressing inflammation and other diseases[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2015, 15(2):135-144.
10 S  leby J, Bouzina H, Lundgren J, et al. Angiogenic and inflammatory biomarkers in the differentiation of pulmonary hypertension[J]. Scand Cardiovasc J, 2017, 51(5):261-270.
11 杨晴, 林刚, 林周, 等. 急性胰腺炎患者血清 ET、MCP-1、TNF-α、IL-6 水平变化及意义[J]. 山东医药, 2018, 58(41):54-56.
12 邵细琴, 陈扬波, 孙妍, 等. 血清可溶性血管内皮生长因子受体-1 在 AECOPD 患者合并肺炎风险评估和预后判断中的价值[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2019, 40(4):583-587+645.
13 C  luiuian EI, Alexandru DO, T  rtea EA, et al. Assessment of T- and B-lymphocytes and VEGF-A in acute pancreatitis[J]. Rom J Morphol Embryol, 2017, 58(2):481-486.

(2020-12-31 收稿 2022-05-26 修回)

tion at delivery[J]. Epigenetics, 2018, 13(7):742-750.
7 Kotake Y, Goto T, Naemura M, et al. Long noncoding RNA PANDA positively regulates proliferation of osteosarcoma cells[J]. Anticancer Res, 2017, 37(1):81-85.
8 杨玲, 马虎, 刘光峨. LncRNA 与非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 耐药关系及机制研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(6):449-454.
9 郑红艳, 李加桩, 鲍永霞, 等. LncRNA: 非小细胞肺癌诊断治疗的新策略[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(4):272-278.
10 Li JW, Yang K, Li C, et al. LncRNA ZNF667-AS1 inhibits inflammatory response and promotes recovery of spinal cord injury via suppressing JAK-STAT pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 15(6):224-227.
11 龚瑾, 徐金环, 肖毅. 抗 CD19/CD22 嵌合抗原受体 T 细胞序贯治疗恶性淋巴瘤并发长 QT 间期综合征 1 例[J]. 内科急危重症杂志, 2021, 27(2):166-169.
12 Feng Huang, Yongliang Yao, Jianhong Wu, et al. Curcumin inhibits gastric cancer-derived mesenchymal stem cells mediated angiogenesis by regulating NF-κB/VEGF signaling[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(12):5538-5547.

(2021-01-18 收稿 2022-07-19 修回)